Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Article
Vol. 15, No.4, 2023, p. 557-569

Meta-Analysis of RNA-Seq and Microarray Expression Data to Identify Genes Effective in Sheep Muscle Growth and Development

Fahime Mohammadi[1], Mojtaba Tahmoorespur[2*], Ali Javadmanesh[3]

1- Ph.D, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3-Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
*Corresponding Author's Email: tahmoores@um.ac.ir

Received: 04-12-2022 Revised: 29-01-2023 Accepted: 05-02-2023 Available Online: 07-06-2022	**How to cite this article:** Mohammadi, F., Tahmoorespur, M., & Javadmanesh, A. (2023). Meta-analysis of RNA-Seq and microarray expression data to identify genes effective in sheep muscle growth and development. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *15*(4), 557-569. **(**in Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.79909.1111

Introduction: Among different sheep breeds in the world, the Texel breed is known as a meaty and muscular muscular breed. Skeletal muscle growth is a step-by-step and exponential process from differentiation, development and maturation, which is regulated by gene networks and cell signaling pathways, and several genes and factors are involved in the process of muscle fiber formation and their growth and hypertrophy (Badday Betti *et al*. 2022). The study of gene expression is done with several methods, and this gene expression information is used in breeding programs as a tool to improve phenotypic choices. Databases are a large source of expression data that can be used by bioinformatics methods to integrate heterogeneous data from different studies and platforms. In this study, by integrating the microarray and RNA-Seq data available in the database belonging to the muscle tissue of Texel breed sheep, the transcriptomic profile of the muscle was compared at two ages of embryonic and adult.

Materials and Methods: Microarray data related to longissimus dorsi muscle tissue with three replicates d-70 embryos from GEO database with accession number GSE23563 and RNA-Seq data related to muscle tissue from six samples with two replicates from adult individuals from ArrayExpress database were selected. Limma, Biobase and GEOquery software packages were used to calculate the expression values of the microarray data related to the embryonic age in the R environment, and Tuxedo, HTSeq and DESeq2 packages were used in the Linux and R environment to calculate the expression values of the RNA-Seq data (Kamali *et al*. 2022; Sahraei *et al*. 2019). Then two types of expression values were integrated and to eliminate non-biological effects, the batch effects were also removed. Next, differential genes were identified with the limma software package. In order to identify the relationship between the identified differential genes, the gene network was drawn between them by software of Cytoscape version 3.7.1 and String 1.5.1 program. next, due to the vastness of the gene network, each network was clustered with MCODE 1.6.1 and CytoCluster 2.1.0 programs (ClusterOne algorithm) and significant clusters (P-value < 0.05) were identified (Saedi *et al*. 2022). In order to better understand the ontology and function of the identified differential genes, the Gene Ontology of the genes was investigated using software of Cytoscape version 3.7.1 and ClueGO 2.5.9 and CluePedia 1.5.9 programs. After receiving the Gene Ontology results, significant Gene Ontology terms (P-Value < 0.05) related to functional groups were identified. Finally, the selected genes (Adj P-Value < 0.05) were identified and introduced in these two age groups.

Results and Discussion: After quality control, correcting and normalizing the microarray data, the GPL10778 platform annotation file with 1042520 Probe ID was used to calculate their expression values. After relevant analyzes of 9289 Probe ID identified related to the data of this study, 7918 Gene Symbol was identified

https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.79909.1111

finally. After quality control, trimming and normalizing the RNA-Seq data in total, the number of Ensembl_Genes based on which the reading values were calculated by HTSeq was 27056. After removing IDs that had zero readings in all 6 samples, 10855 IDs remained. Then, these 10855 Ensembl ID were merged with the annotation file to obtain Gene Symbol, and finally 9417 common genes were identified between the six samples of adult age. The results of differential expression analysis showed that there were significant differences in the expression of 62 genes (37 increased and 25 decreased) in the muscle tissue between adult and embryonic age. By creating a gene network between differential genes, 15 selected genes were identified, including MYH1, ACTN3, CASQ1, TMOD4, FBP2, SLC2A4, MX1, COX4I1, SOD2, MFN2, UQCRB, UCP3, PRKAB2, PHKG2, PPP1R3C. The function of these genes has been proven in cell proliferation, protein synthesis, myofibril formation, and lipid metabolism. Differential gene enrichment analysis revealed some biological processes such as Vasculogenesis, positive regulation of ossification, positive regulation of muscle tissue development, regulation of muscle contraction, contractile fiber part, calcium signaling, calcineurin-NFAT signaling cascade and regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT, the molecular function of regulating cation channel activity and the cellular components of the contractile fiber.

Conclusion: This study in addition to confirming the accuracy of the integration method of two types of heterogeneous data, provided a general view of the transcriptomic differences of Texel sheep muscle tissue at two important age points to be a useful source for biological investigations of genes related to muscle growth and development in sheep.

Keywords: Data Integration, Differential Gene Expression, Gene Network, Gene Ontology

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲، ص. ۵۶۹-۵۵۷

فراتحلیل داده‌های بیانی RNA-Seq و Microarray برای شناسایی ژن‌های مؤثر در رشد و نمو عضله گوسفند

فهیمه محمدی[۱]، مجتبی طهمورث‌پور[۲]*، علی جوادمنش[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶

چکیده

امروزه می‌توان با روش‌های بیوانفورماتیکی داده‌های حاصل از مطالعات و پلتفرم‌های مختلف را ادغام و از آن‌ها بهره برد. در این مطالعه، با ادغام داده‌های ریزآرایه و RNA-Seq بافت عضله گوسفند نژاد تکسل موجود در پایگاه داده به مقایسه پروفایل ترنسکریپتومی عضله در دو مقطع سنی جنینی و بلوغ پرداخته شد. برای محاسبه مقادیر بیانی عضله ریزآرایه مربوط به دوران جنینی از بسته‌های نرم‌افزاری Limma، Biobase و GEOquery در محیط R و برای محاسبه مقادیر بیانی عضله RNA-Seq از پروتکل Tuxedo و بسته نرم‌افزاری HTSeq در محیط لینوکس و بسته‌نرم‌افزاری DESeq2 در محیط R استفاده شد. سپس دو نوع مقادیر بیانی ادغام شدند. نتایج نشان داد، در بافت عضله بین مقطع سنی بلوغ و جنینی بیان ۶۲ ژن (۳۷ ژن افزایش و ۲۵ ژن کاهش بیان) اختلاف معناداری داشتند. با رسم شبکه ژنی بین ژن‌های افتراقی، ۱۵ ژن منتخب MYH1، ACTN3، CASQ1، TMOD4، FBP2، SLC2A4، MX1، COX4I1، SOD2، MFN2، UQCRB، UCP3، PRKAB2، PHKG2، PPP1R3C شناسایی شدند. عملکرد این ژن‌ها در تکثیر سلولی، تشکیل میوفیبریل‌ها و متابولیسم‌های چربی‌زایی ثابت شده‌است. آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های افتراقی نقش برخی از این ژن‌ها مثل ACTN3 وCASQ1 را در فرآیندهای زیستی مثل توسعه سلول عضلانی مخطط، مسیرهای علامت‌دهی Calcineurin-NFAT و JAK-STAT آشکار کرد. این مطالعه علاوه‌بر تأیید روش ادغامی داده‌های ناهمگن، دیدی کلی از تفاوت‌های ترنسکریپتومی بافت عضله گوسفند تکسل در دو مقطع مهم سنی را فراهم آورد تا ژن‌های منتخب معرفی‌شده منبع مفیدی برای بررسی‌های زیستی ژن‌های مربوط به رشد و نمو عضله باشد.

واژه‌های کلیدی: ادغام داده‌های ناهمگن، بیان افتراقی ژن‌ها، شبکه ژنی، هستی‌شناسی ژن‌ها

مقدمه

تشکیل میوفیبریل‌های عضله، طی فرآیندی به‌نام میوژنز صورت می‌گیرد و در گونه‌هایی مانند گوسفند، حداکثر تشکیل میوفیبریل عضله در دوران جنینی است. میوژنز قبل از تولد شامل میوژنز اولیه و ثانویه است. میوژنز اولیه در مرحله رویانی و میوژنز ثانویه در مرحله جنینی رخ می‌دهد و موجب تشکیل فیبرهای عضلانی ثانویه می‌شود. بنابراین، دورانی که میوژنز ثانویه در حال انجام است، برای رشد عضلات اسکلتی حیاتی است (Yan *et al.*, 2013). بیش از سه موج میوژنز ثانویه قبل از تولد در گوسفند ظاهر می‌شود و اکثر میوفیبریل‌ها بعد از ۶۰ روزگی آبستنی تشکیل می‌شوند (Rashidian *et al.*, 2020). رشد بافت‌های عضلانی بعد از تولد نیز فقط توسط هایپرتروفی رخ می‌دهد و شامل تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای، تمایز و تجزیه و بازسازی پروتئین‌ها است (Sadkowski *et al.*, 2006). امروزه از اطلاعات بیان ژن در برنامه‌های اصلاح‌نژادی به‌عنوان ابزاری برای بهبود انتخاب‌های فنوتیپی استفاده می‌شود. تا کنون چندین گزارش از بررسی ترنسکریپتوم بافت عضله در گوسفند ثبت شده است

۱- دانش آموخته‌ی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: tahmoores@um.ac.ir
https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.79909.1111

(Mohammadi *et al*., 2019; Betti *et al*., 2022). در سال ۲۰۱۳ ژانگ و همکاران (Zhang *et al*., 2013) روش RNA-Seq را برای تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای ترنسکریپتوم عضله یک ماده ۱۱ ماهه در دو نژاد دورپر[1] و دنبه کوچک هان[2] به‌کار بردند. در نهایت، ۱۳۰۰ ژن به‌طور معنی‌داری تفاوت بیان نشان دادند. همچنین پروفایل ترنسکریپتوم بافت عضله از سه ماده یک‌ساله در دو نژاد مرینوی گوشتی چین‌خوا[3] و دنبه کوچک هان هم توسط سون و همکارانش (Sun *et al*., 2016) مورد مطالعه قرار گرفت که در نهایت، ۹۶۰ ژن تفاوت بیان معنی‌داری نشان دادند. نتایج نشان داد که برخی از ژن های افتراقی شناسایی شده از جمله MRFs، GXP1 و STAC3، نقش مهمی در روند رشد و تکامل عضلات بازی می‌کنند. مقایسه ترنسکریپتوم بافت عضله اسکلتی در دوران قبل از تولد در دو نژاد گوسفند دورست و دنبه کوچک هان توسط لیو و همکاران (Liu *et al*., 2015) انجام شد. در این مطالعه، با روش ریزآرایه از بافت عضله در سنین ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روزگی جنینی نمونه‌برداری شد و بعد از آنالیزهای مربوطه به‌ترتیب ۸۸ ، ۱۲۸ و ۳۴۰ ژن بین دو نژاد شناسایی شد. در ادامه با تولید و انباشت مجموعه زیادی از داده‌ها، متاآنالیز برای ترکیب چندین مطالعه برای افزایش قدرت آماری محبوبیت زیادی پیدا کرد (Bakhshalizadeh *et al*., 2021; Zerehdaran *et al*., 2020). تا جایی که در سال ۲۰۱۷ چندین مطالعه در زمینه ادغام داده‌های حاصل از روش ریزآرایه و RNA-Seq ((Ma *et al*., 2017) و (Jung *et al*., 2017)) منتشر شد که نتایج این مطالعات حاکی از صحت بالای روش ادغامی و بهبود دقت و قدرت نتایج بود. ادغام روش‌های مختلف با در نظر گرفتن اصول صحیح آنالیز، کمک شایان توجهی نیز به افزایش تعداد نمونه‌های مطالعه می‌کند که خود ممکن است، باعث افزایش صحت نتایج می‌شود. از آنجایی که بررسی پروفایل ترنسکریپتومی بافت عضله طی مراحل جنینی تا بعد از تولد و بلوغ توسط فن‌آوری‌هایی مثل ریزآرایه و RNA-seq، بررسی جامع‌تری از ژن‌ها، عوامل تنظیم‌کننده‌ای که بر رشد عضلات مؤثرند را ارائه خواهد داد، هدف مطالعه حاضر تهیه تصویر جامعی از مراحل کلیدی رشد و نمو گوسفند نژاد تکسل به‌عنوان یک گوسفند گوشتی با فنوتیپ عضلانی است. همچنین، دانش بهتر از معماری مولکولی و ژنتیکی بافت عضله، ممکن است منجر به ایجاد فرصت‌های جدیدی در زمینه اصلاح‌نژاد برای پرورش گوسفند گوشتی شود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از دو مجموعه عضله ریزآرایه و RNA-Seq در نژاد تکسل استفاده شد. داده‌های ریزآرایه مربوط به بافت عضله لانژیسیموس دورسی با سه تکرار در دوران ۷۰ روزگی جنینی از پایگاه GEO با شماره دسترسی GSE23563 به آدرس https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE23563 انتخاب شد. بررسی کیفیت، تصحیح، نرمال‌سازی و محاسبه مقادیر بیانی ژن‌ها همگی در محیط R4.2.1 و توسط بسته نرم‌افزاری Biobase Limma، GEOquery انجام شد. داده‌های RNA-Seq مربوط به بافت عضله از شش نمونه با دو تکرار مربوط به دوران بلوغ از پایگاه ArrayExpress به آدرس https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-3838/samples/ انتخاب شدند. آنالیز داده‌های RNA-Seq در محیط لینوکس اوبنتو انجام شد. بررسی کیفیت داده‌های RNASeq با نرم‌افزار fastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) انجام شد. سپس برای پیرایش و فیلتر خوانش‌های نامطلوب از نرم‌افزار Trimmomatic-0.36 (http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/Trimmomatic-0.36.zip) استفاده شد. دستور پیرایش بر اساس حذف خوانش‌های با نمره کمتر از phred 33، حذف یک باز را از ابتدای خوانش، حذف خوانش‌هایی با طول کمتر از ۳۶ باز، شناسایی آلودگی آداپتوری با دو باز غیر منطبق بود. برای نقشه‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم و ترنسکریپتوم مرجع گوسفند (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-99/fasta/ovis_aries/dna/) از نرم‌افزار HISAT2 2.2.0 (http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml) استفاده شد. با توجه به اینکه نرم‌افزار HISAT2 ژنوم مرجع ایندکس‌شده را به‌عنوان ورودی می‌پذیرد، بدین منظور از نرم‌افزار Bowtie2 (http://bowtiebio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml) استفاده شد. فرمت فایل خروجی hisat2، sam است و چون برای ادامه مراحل فرمت به‌صورت bam موردنیاز است، از نرم‌افزار samtools-1.9 (https://sourceforge.net/projects/samtools/files/samtools/) استفاده شد. در ادامه برای محاسبه مقادیر خوانش‌های نقشه‌یابی شده در هر ناحیه از نرم‌افزار HTSeq-0.6.1 (https://pypi.org/project/HTSeq/) استفاده شد. برای نرمال‌سازی داده‌ها و محاسبه مقادیر بیانی داده‌های RNASeq نیز از بسته DESeq2 استفاده شد. جهت ادغام دو نوع مقادیر بیانی حاصل از داده‌های ریزآرایه و RNASeq، ابتدا دو مجموعه داده فراخوانی و در نهایت، هر دو مجموعه با هم ادغام شد. در ادامه، جهت حذف اثرات غیر بیولوژیکی، اثرات دسته[4] هم حذف و ژن‌های افتراقی محاسبه شدند. جهت شناسایی ارتباط بین ژن‌های افتراقی شناسایی شده، شبکه ژنی بین آن‌ها توسط نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.7.1 و

1- Dorper
2- Small-tailed han sheep
3- Qianhua
4- Batch effect

برنامه STRING 1.5.1 رسم شد. سپس به‌دلیل وسیع بودن شبکه ژنی، خوشه‌بندی هر شبکه با افزونه‌های MCODE 1.6.1 و CytoCluster 2.1.0 (الگوریتم ClusterOne) صورت گرفت و خوشه‌های معنی‌دار (P-value < 0.05) شناسایی شد. جهت بررسی و درک بهتر ماهیت و عملکرد ژن‌های افتراقی شناسایی شده، هستی شناسی[1] ژن‌ها به‌وسیله نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.7.1 و افزونه های ClueGO 2.5.9 و CluePedia 1.5.9 بررسی شد. بدین منظور، ژن‌های افتراقی شناسایی شده به افزونه ClueGO معرفی شد و بعد از دریافت نتایج هستی‌شناسی، عبارات هستی‌شناسی معنی‌دار (P-value < 0.05) مرتبط با گروه‌های کارکردی شناسایی شد. در نهایت نیز ژن‌های منتخب (Adj P-value < 0.05) در این دو مقطع سنی شناسایی و معرفی شد.

نتایج و بحث

بعد از بررسی کیفیت، تصحیح، نرمال‌سازی و محاسبه مقادیر بیانی داده‌های ریزآرایه با استفاده از فایل حاشیه‌نویسی پلت‌فرم GPL10778، در نهایت ۷۹۱۸ ژن شناسایی شد. همچنین بررسی کیفیت داده‌های RNA-Seq مشخص کرد که کیفیت همه خوانش‌های حاصل از توالی‌یابی تا حدود بسیاری مناسب بود و متوسط کیفیت بازهای خوانده‌شده بالای ۲۵ (احتمال وجود یک باز اشتباه در هر سه خوانش ۱۰۰ بازی) بود. در جدول ۱، اطلاعات آماری خوانش‌ها قبل و بعد از آنالیز برای نمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش گزارش شده است.

تعداد ژن‌هایی که بر مبنای آن‌ها مقادیر خوانش‌ها توسط HTSeq محاسبه شد، ۲۷۰۵۶ بود. بعد از حذف شناسه‌های ژنی که دارای مقدار خوانش صفر در هر شش نمونه بودند، ۱۰۸۵۵ آیدی باقی ماند. سپس این Ensembl ID ۱۰۸۵۵ با فایل حاشیه‌نویسی جهت به‌دست آوردن علامت اختصاری ژن ادغام شدند که در نهایت، ۹۴۱۷ ژن مشترک بین شش نمونه مقطع بلوغ شناسایی شد. در ادامه، بعد از اینکه برای محاسبه بیان افتراقی ژن‌ها، هر دو نوع مقادیر بیانی داده های ریزآرایه و RNASeq حاصل از مراحل قبلی با یکدیگر ادغام شدند، اثرات دسته نیز که به‌دلیل متفاوت بودن تکنیک تولید دو نوع داده وجود داشت، حذف و نمودار آن‌ها رسم شد. شکل ۱، نمودار جعبه ای داده‌های ادغام شده و شکل ۲، نمودار PCA داده‌های ادغام شده را نشان می‌دهد.

در مجموع، بین مقطع جنینی و بلوغ، ۶۲ ژن افتراقی (FDR-adj.P.Val < 0.05) شناسایی شد که از این میان، ۳۷ ژن افزایش بیان (logFC > 1) و ۲۵ ژن کاهش بیان (logFC < -1) داشتند.

جدول‌های ۲ و ۳ به‌ترتیب ژن‌های با افزایش و کاهش بیان در این مقطع سنی را نشان می‌دهد.

بعد از رسم شبکه تعاملی بین ژن‌های افتراقی شناسایی شده با نرم‌افزار Cytoscape و برنامه STRING، خوشه‌های ژنی معنی‌دار با افزونه CytoCluster و عبارات هستی‌شناسی و مسیرهای معنی‌دار آن‌ها با افزونه‌های ClueGO و CluePedia شناسایی شدند. از میان ۶۲ ژن افتراقی شناسایی شده، بین دو مقطع ۷۰ روزگی جنینی و بلوغ، در نهایت، شبکه تعامل ژنی میان ۴۷ ژن رسم شد (شکل ۳). در ادامه، سه خوشه ژنی معنی‌دار (P-value < 0.05) نیز شناسایی شد که هر خوشه به همراه مقدار P-value آن روی هر شبکه مشخص شده است.

اولین خوشه معنی‌دار با P-value = 0.004 بر روی شبکه ژنی نشان داده شده‌است. این خوشه با پنج گره شامل ژن‌های CASQ1، TMOD4، ACTN3، MYH1 و FBP2 است که همگی دارای بیان بالا (UP) بوده‌اند. ژن‌های این خوشه به نحوی در انقباض و هایپرتروفی عضلات نقش دارند و افزایش بیان این ژن‌ها در عضله در زمان بلوغ نسب به دوران جنینی امری طبیعی است. ژن MYH1 که بیشتر در فیبرهای عضله نوع تند (سریع) بیان می‌شود و در عضله مخطط وجود دارد، یک پروتئین انقباضی عمده است که از طریق هیدرولیزATP انرژی شیمیایی را به انرژی مکانیکی تبدیل می‌کند. (Weiss *et al.*, 1999). کالسوکوئسترین که توسط ژن CASQ1 کدگذاری می‌شود، یک پروتئین متصل به کلسیم است که به‌عنوان یک بافر کلسیم در شبکه سارکوپلاسمی عمل می‌کند. (Terentyev *et al.*, 2003). آلفا اکتینین پروتئینی است که توسط ژن ACTN3 رمزگذاری می‌شود و در صفحات Z و اجسام متراکم قرار دارد و به لنگر انداختن رشته‌های اکتین میوفیبریلار کمک می‌کند (Beggs *et al.*, 1992). میوزنین-۱پروتئینی است که توسط ژن MYOZ1 کدگذاری می‌شود و به‌عنوان پروتئین‌های اتصال‌دهنده داخل سلولی در ارتباط با پروتئین‌های صفحات Z خدمت می‌کنند. همچنین این پروتئین ممکن است در میوفیبریلوژنز نقش داشته باشد (Takada *et al.*, 2001). ژن TMOD4 پروتئین تروپومودولین ۴ (عضله) را رمزگذاری می‌کند و انتهای نوک رشته‌های اکتین را می‌پوشاند و یک چارچوب ساختاری برای سفت و سخت نگه داشتن رشته‌های اکتین فراهم می‌کند. (Almenar-Queralt *et al.*, 1999). ژن FBP2 هم که پروتئین فروکتوز بیس فسفاتاز ۲ را کدگذاری می‌کند، یک آنزیم تنظیم‌کننده گلوکونئوژنز است که هیدرولیز فروکتوز ۱،۶- بیس فسفات را به فروکتوز ۶- فسفات و فسفات معدنی کاتالیز می‌کند (Rakus *et al.*, 2005).

دومین خوشه معنی‌دار با P-value = 0.018 بر روی شبکه ژنی مشخص شده‌است. این خوشه با هفت گره شامل ژن‌های SLC2A4، MX1، COX4I1، SOD2، MFN2، UQCRB و UCP3 است که

1- Gene ontology

همگی دارای بیان بالا (UP) بوده‌اند.

ژن SLC2A4 از این خوشه به‌عنوان ژن‌های افتراقی در مقایسه ترنسکریپتوم بافت عضله بین دو نژاد مرینوی گوشتی چین‌خوا و دنبه کوچک هان توسط سون و همکارانش شناسایی و گزارش شده‌است (Sun *et al*., 2016). این ژن، پروتئین ناقل گلوکز نوع ۴-GLUT) (4را که جزو خانواده حامل‌های تسهیل‌شده گلوکز هم شناخته می شود رمزگذاری می‌کند.GLUT4 یک حمل‌کننده گلوکز وابسته به انسولین است که در بافت چربی و عضلات مخطط (ماهیچه اسکلتی و ماهیچه قلب) وجود دارد. این پروتئین، انتشار حامل گلوکز را از خلال غشای سلول پستانداران تسهیل می‌کند و اجازه انتشار آسان گلوکز در گردش را در شیب غلظت آن در سلول‌های ماهیچه و چربی می‌دهد (Huang and Czech, 2007).

جدول ۱- اطلاعات آماری خوانش‌ها (نقشه‌یابی شده برروی ژنوم مرجع و محاسبه شده توسط HTSeq)

Table 1- Statistical information of the reads (mapped on the reference genome and calculated by HTSeq)

نمونه‌ها Samples	مجموع توالی داده‌های خام Total seq. of raw data	درصد GC GC%	مجموع توالی داده‌های پیرایش شده Total seq. of trimmed data	نرخ هم‌ردیفی کلی Overall alignment rate%	تعداد ژن Ensembl Gene	خوانش کل Total counts
A[1]-F[2]-1	19697023	46 & 46	15023092	94.04	5882	113446
A-F-2	19792913	46 & 46	10350142	94.22	4981	78175
A-M[3]-3	9016506	46 & 46	7220274	91.87	3937	63936
A-M-4	5771315	45& 45	4633682	89.71	3077	39784
A-M-5	9285314	46 & 46	7445816	91.85	3968	65933
A-M-6	5852296	45& 45	4703164	89.99	3061	39651

شش نمونه از 1 تا 6 نامگذاری شده‌اند.

۱ بالغ

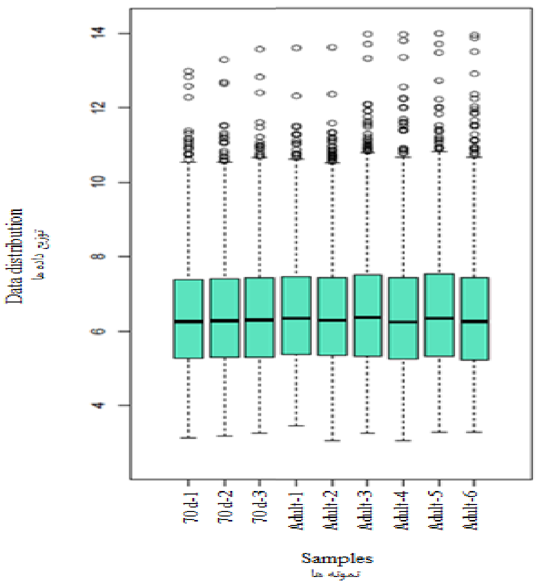
۲ ماده

۳ نر

1 Adult

2 Female

3 Male



شکل ۱- نمودار جعبه‌ای پراکنش مقدار بیان ژن‌های حاصل از روش ریزآرایه و RNASeq بعد از ادغام و حذف اثرات دسته

Figure 1- Boxplot of the distribution of gene expression values obtained from microarray and RNASeq methods after integration and removing batch effect

نواحی سبز رنگ شامل چارک اول، چارک میانی و چارک سوم است.

The green areas include the first quartile, the middle quartile, and the third quartile.

جدول ۲- ژن‌های با افزایش بیان بین مقطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی

Table 2- Genes with increased expression between adult and 70 days of embryonic age

نماد ژن Gene symbol	لگاریتم تغییر بیان logFC	بیان متوسط AveExpr	آزمون-T T-test	مقادیر-P P-value	مقادیر-P تنظیم شده Adj.P–val	بونفرونی Bonferroni
FBP2	3.034244	7.453365	5.539103	8.48E-06	0.001991	3.670732
PPP1R3C	2.823403	10.138	3.91733	0.000589	0.024217	-0.32517
HSD11B1	2.782934	6.12764	6.866368	2.92E-07	0.000161	6.835957
MYH1	2.260161	11.59883	8.366309	8.3E-09	1.36E-05	10.13162
ACTN3	2.178041	8.273333	4.354317	0.000189	0.012926	0.744079
SLC2A4	2.054425	7.460889	5.582893	7.57E-06	0.001914	3.777934
KLF9	1.963932	5.503618	7.091172	1.68E-07	0.00015	7.350841
COX4I1	1.927319	9.562411	5.445294	1.08E-05	0.002093	3.440628
FGL2	1.924955	6.438032	5.259021	1.76E-05	0.002754	2.982131
TMOD4	1.863128	8.802091	4.765696	6.41E-05	0.006388	1.761543
MX1	1.846713	6.704768	3.995615	0.000481	0.021306	-0.13506
MBP	1.795783	7.179845	4.716971	7.29E-05	0.007046	1.640821
UQCRB	1.719672	9.54251	5.127208	2.48E-05	0.003055	2.656649
PLN	1.705074	7.953816	3.671922	0.001108	0.036073	-0.91539
CAV1	1.674279	6.466443	4.671898	8.2E-05	0.007491	1.529168
ALDH1A1	1.581084	6.428051	5.793099	4.4E-06	0.001204	4.290455
NOSTRIN	1.453875	5.335228	6.130006	1.85E-06	0.000554	5.10352
AASS	1.40669	5.367752	5.088528	2.75E-05	0.003227	2.561013
UCP3	1.391164	4.897552	3.749894	0.000908	0.032785	-0.72891
CTSL1	1.378055	7.631864	4.188295	0.000291	0.016767	0.335773
NFAT5	1.320186	7.125953	4.058485	0.000409	0.019385	0.018143
AFF1	1.30939	6.417712	5.037472	3.14E-05	0.003562	2.434704
SOD2	1.278101	6.632185	4.075197	0.000391	0.019196	0.058941
C1orf21	1.276609	6.198659	3.73043	0.000954	0.033723	-0.77556
AMOT	1.274326	7.106552	3.860116	0.000683	0.027392	-0.4636
CASQ1	1.269251	8.953483	3.686058	0.001069	0.036073	-0.88166
PECAM1	1.26162	8.528891	3.988622	0.00049	0.021306	-0.15208
NAMPT	1.252677	6.575231	3.677914	0.001092	0.036073	-0.9011
CA2	1.24611	5.798616	4.286247	0.000226	0.014539	0.576431
VEGFA	1.216136	6.898503	4.331761	0.0002	0.013164	0.688492
PRKCZ	1.18494	5.038701	4.110057	0.000357	0.018944	0.144137
MTUS1	1.127114	6.009025	3.852893	0.000696	0.027571	-0.48104
PTPN14	1.085529	7.391925	3.59518	0.001348	0.040657	-1.09786
SYBU	1.081182	5.567166	3.733414	0.000947	0.033723	-0.76841
AKAP7	1.076681	5.927487	5.367946	1.32E-05	0.002351	3.25048
MFN2	1.026356	7.883619	3.803323	0.000791	0.030185	-0.60054
PRKAB2	1.004612	6.775296	3.674774	0.0011	0.036073	-0.90859

پروتئین‌های GTPase،Mxهای نشانگر القای اینترفرون هستند که در طیف وسیعی از سلول‌ها مانند ماکروفاژ و سلول‌های کبدی بیان شده و در تنظیم سامانه ایمنی در سلول نقش دارند (Horisberger, 1992). ایزوفرم زیر واحد ۴ سیتوکروم c اکسیداز میتوکندریایی، آنزیمی است که توسط ژن COX4I1 رمزگذاری می‌شود.

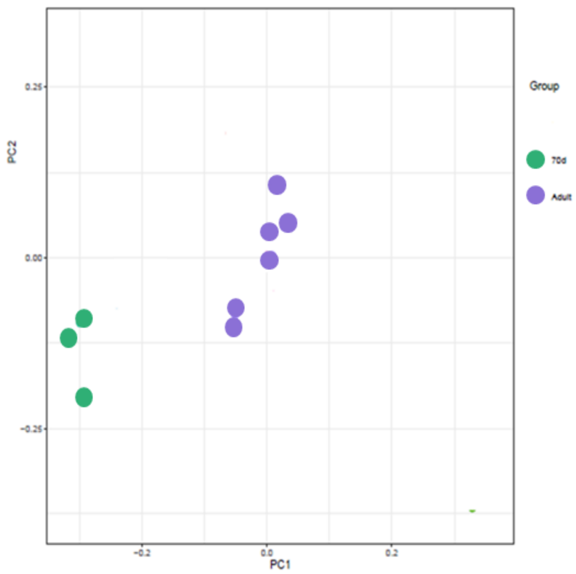
سیتوکروم c اکسیداز (کمپلکس IV) یک مجموعه آنزیمی چند زیرواحدی است که انتقال الکترون از سیتوکروم c به اکسیژن مولکولی را جفت می‌کند و به شیب الکتروشیمیایی پروتون کمک می‌کند (Huttemann *et al.*, 2001). سوپراکسید دیسموتاز ۲ میتوکندریایی (SOD2) که به‌عنوان سوپراکسید دیسموتاز وابسته به منگنز (MnSOD) شناخته می‌شود، آنزیمی است که توسط ژن SOD2کدگذاری می‌شود. این پروتئین به محصولات جانبی سوپراکسید فسفوریلاسیون اکسیداتیو متصل شده و آن‌ها را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن دیاتومیک تبدیل می‌کند. این عملکرد به SOD2اجازه می‌دهد تا محافظت در برابر مرگ سلولی را به همراه داشته باشد (Zelko *et al*., 2002). میتوفوزین -۲ پروتئینی است که توسط ژن MFN2 کدگذاری می‌شود. میتوفوزین‌ها GTPase هایی هستند که در غشای خارجی میتوکندری جاسازی شده‌اند. در پستانداران MFN1 و MFN2 برای هم‌جوشی میتوکندری ضروری است (Filadi *et al.*, 2018). پروتئین متصل به-Ubiquinol cytochrome c ردوکتاز که به‌عنوان UQCRB هم شناخته می‌شود، جزئی از زنجیره تنفسی میتوکندری است و به‌عنوان مجموعه‌ای از ubiquinone و QP-C نقش مهمی در انتقال الکترون دارد (Jung *et al.*, 2011). پروتئین جفت نشده شماره ۳ میتوکندریایی پروتئینی

است که توسط ژن UCP3 کدگذاری می‌شود. خانواده پـروتئین‌هـای جفت نشده نقش مهمی در هموستاز انرژی ایفا می‌کنند و بنابراین، در بروز چاقی می‌تواند مؤثر باشد (Boss *et al*., 1998).

جدول ۳- ژن‌های با کاهش بیان بین مقطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی

Table 3- Genes with decreased expression between adult and 70 days of embryonic age

نماد ژن Gene symbol	لگاریتم تغییر بیان logFC	بیان متوسط AveExpr	آزمون-T T-test	مقادیر-P P-value	مقادیر-P تنظیم شده adj.P-val	بونفرونی Bonferroni
NNAT	-2.41962	8.500148	-4.04752	0.00042	0.019467	-0.00862
ACOT7	-1.7284	5.420076	-6.51776	6.95E-07	0.000286	6.02412
IGFBP2	-1.55898	7.795998	-7.05712	1.83E-07	0.00015	7.273291
SFRP2	-1.49095	7.345442	-4.78297	6.13E-05	0.006295	1.804346
ISYNA1	-1.41615	5.849885	-8.49402	6.21E-09	1.36E-05	10.39651
ABI3BP	-1.38777	8.139394	-4.24061	0.000254	0.015223	0.464209
CTNNB1	-1.34473	9.220989	-4.2457	0.000251	0.015223	0.476728
SNAP25	-1.34138	5.926042	-6.8015	3.43E-07	0.000161	6.686106
MLLT11	-1.28446	5.608408	-6.27621	1.28E-06	0.00042	5.452683
VCAN	-1.26264	6.098742	-4.56524	0.000109	0.008921	1.265119
HN1	-1.23088	7.958271	-4.54582	0.000114	0.009159	1.21707
ERBB3	-1.2049	7.262624	-3.71656	0.000989	0.034048	-0.80877
VSNL1	-1.20476	4.388637	-4.5276	0.00012	0.009379	1.17199
KIAA0101	-1.19771	7.019201	-5.18265	2.15E-05	0.003055	2.793629
ACAN	-1.19551	4.322863	-3.59735	0.001341	0.040657	-1.09271
CDK2AP1	-1.1836	8.28275	-3.97701	0.000505	0.021557	-0.18032
AGTR2	-1.08291	5.009504	-6.82985	3.19E-07	0.000161	6.751666
PIGU	-1.07011	8.185229	-5.12811	2.48E-05	0.003055	2.658887
MFAP2	-1.05935	8.882939	-4.06435	0.000402	0.019385	0.032461
EMILIN2	-1.03678	6.224918	-4.38136	0.000176	0.012298	0.810768
INTS10	-1.0179	5.922382	-3.53011	0.001591	0.044407	-1.25166
CKS2	-1.01125	7.343007	-4.49475	0.000131	0.009758	1.090771
TTLL1	-1.01047	4.55422	-6.36673	1.02E-06	0.000371	5.667644
PHKG2	-1.00799	6.056636	-4.4255	0.000157	0.011313	0.919692
CCNB1	-1.00222	6.348495	-4.64391	8.83E-05	0.007505	1.459842

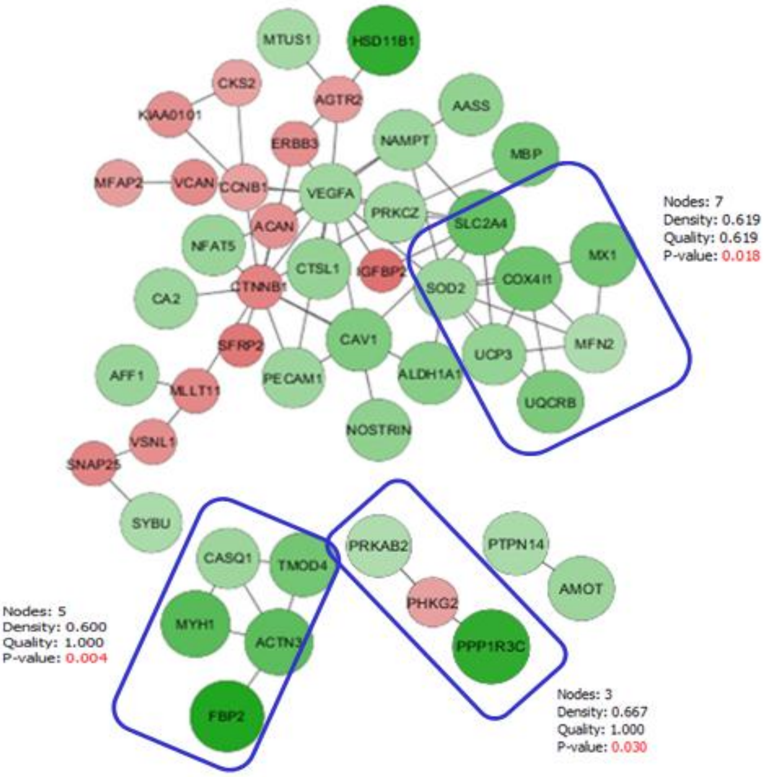


شکل ۲- نمودار PCA داده‌های ریزآرایه و RNASeq بعد از ادغام و حذف اثرات دسته

Figure 2- PCA plot of microarray and RNASeq data after integration and removing batch effect

داده‌های مربوط به هر مقطع سنی با رنگ جداگانه (رنگ سبز برای مقطع ۷۰ روزگی و رنگ بنفش برای مقطع بلوغ) مشخص شده‌اند.

The data related to each age group are marked with a separate color (green color for the 70-day age and purple color for the adult).



شکل ۳- خوشه‌های معنی‌دار شبکه تعاملی ژن‌های افتراقی شناسایی شده بین بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی

Figure 3- Significant clusters of the interaction network of identified DEGs between Adult and 70 days of embryonic age

در این شبکه، ژن‌های با گره‌های بزرگ و سبز تیره، بالاترین بیان و گره‌های کوچک‌تر و قرمز، کمترین بیان را دارند.

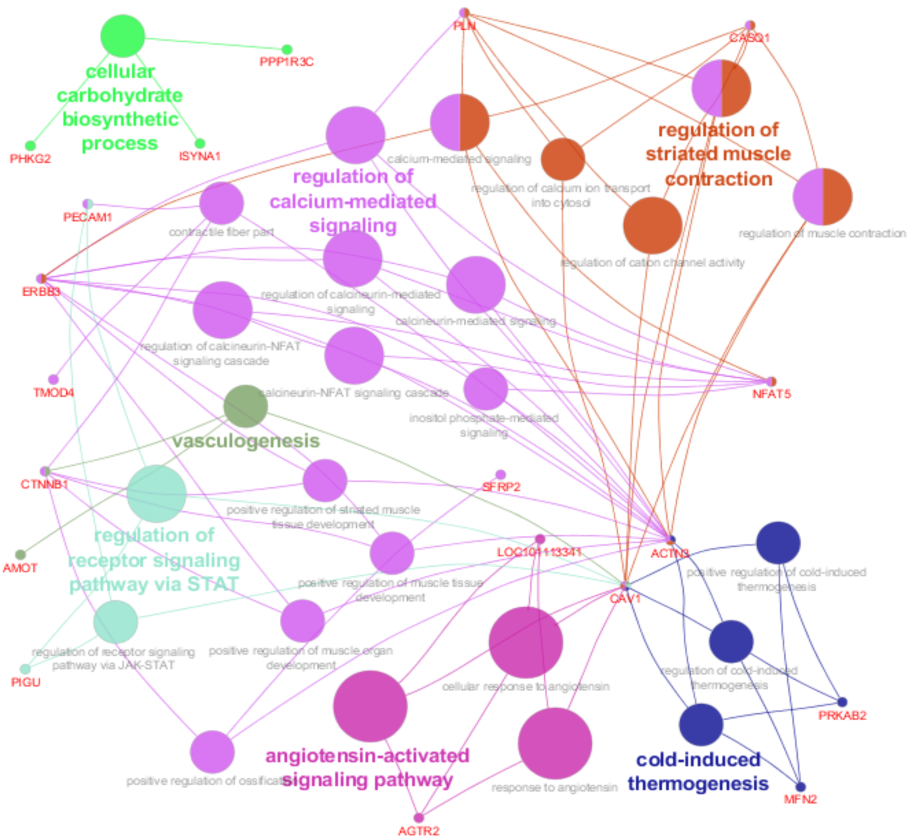
In this network, genes with large and dark green nodes have the highest expression and smaller and red nodes have the lowest expression.

سومین خوشه معنی‌دار با P-value = 0.030 بر روی شبکه ژنی مشخص شده‌است. این خوشه با سه گره شامل ژن‌های PRKAB2، PHKG2 و PPP1R3C است که ژن PPP1R3C و PRKAB2 دارای بیان بالا و ژن PHKG2 دارای بیان کم بودند. ژن PPP1R3C از این خوشه به‌عنوان ژن‌های افتراقی در مقایسه ترنسکریپتوم بافت عضله بین دو نژاد مرینوی گوشتی چین‌خوا و دنبه کوچک هان توسط سون و همکارانش شناسایی و گزارش شده‌است (Sun *et al*., 2016). این ژن‌ها در تأمین و تنظیم انرژی سلول‌ها و احتمالاً فسفریله و غیرفعال کردن آنزیم‌های مسئول بیوسنتز اسیدهای چرب و کلسترول دخیل هستند. زنجیره کاتالیتیکی فسفوریلاز b کیناز گاما آنزیمی است که توسط ژن PHKG2 رمزگذاری می‌شود. بیشترین فراوانی بیان این ژن در کبد و عضلات گزارش شده‌است. این ژن نقش مهمی در تأمین انرژی سلول‌ها دارد و گلوکزی که به شکل گلیکوژن در سلول‌های عضلانی و کبدی ذخیره می‌شود را در صورت نیاز به گلوکز به‌سرعت تجزیه می‌کند (Huang *et al*., 1994). ژن PPP1R3C آنزیم زیرواحد تنظیمی ۳ C پروتئین فسفاتاز ۱ که به‌عنوان PTG هم شناخته می‌شود را رمزگذاری می‌کند. پروتئین فسفاتاز ۱-(PP1) در تنظیم طیف گسترده‌ای از عملکردهای سلولی توسط فسفوریلاسیون برگشت‌پذیر پروتئین شرکت می‌کند (Doherty *et al*., 1997). زیر واحد بتا-۲ پروتئین کیناز فعال-'5 AMP آنزیمی است که توسط ژن PRKAB2 رمزگذاری می‌شود. پروتئین رمزگذاری شده توسط این ژن، زیر واحد تنظیم‌کننده پروتئین کیناز فعال شده توسط AMP (AMPK) است. AMPK یک آنزیم مهم انرژی‌سنج است که می‌تواند افزایش نسبت AMP/ATP و ADP/ATP در سلول‌های استرس‌دیده را کشف نموده و تعادل انرژی را تنظیم نماید و در واقع، وضعیت انرژی سلولی را کنترل نماید. این زیر واحد ممکن است تنظیم‌کننده‌ای مثبت بر فعالیت AMPK باشد و چون در ماهیچه‌های اسکلتی بسیار بیان می‌شود، بنابراین ممکن است نقش‌های خاص بافتی داشته باشد (Cheung *et al*., 2000). کاهش دادن AMPK فعال، موجب افزایش mTORC1 فعال در ماهیچه اسکلتی و افزایش حجم ماهیچه می‌شود. این نشان می‌دهد، AMPK ساخت پروتئین در ماهیچه اسکلتی را تنظیم می‌نماید.

در ادامه، برای مرتبط کردن DEGهای این مقطع سنی به دسته‌بندی‌های احتمالی خود، آنالیز غنی‌سازی هستی‌شناسی ژنی در سه گروه فرآیند بیولوژیکی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی صورت گرفت. آنالیز غنی‌سازی برای DEGهای میان مقطع سنی بلوغ و جنینی نشان داد، ۲۵ فرآیند زیستی به‌شکلی معنی‌دار غنی‌سازی شده‌اند (P-adj Bonf > 0.05) که عمدتاً فرآیندهای زیستی مربوط به فرآیند استخوان‌سازی، تنظیم مثبت رشد اندام و بافت‌های عضلانی، مسیر و پاسخ‌های آنژیوتنسین، تنظیم انقباض عضله مخطط، سیگنالینگ واسطه کلسینورین، مسیر علامت‌دهی Calcineurin-NFAT و تنظیم آن، تنظیم مسیر علامت‌دهی گیرنده از طریق JAK-STAT، علامت‌دهی با واسطه کلسیم، فرآیند ساخت کربوهیدرات سلولی بودند. همچنین یک عملکرد مولکولی به شکلی معنی‌دار غنی‌سازی شده است (P-adj Bonf > 0.05) که مربوط به تنظیم فعالیت کانال کاتیونی است. یک اجزای سلولی نیز به شکلی معنی‌دار غنی‌سازی شده است (P-adj Bonf > 0.05) که مربوط به فیبر انقباضی است. نتایج هستی‌شناسی این ژن‌ها در این مقطع سنی در شکل ۴ و جدول ۴ نشان داده شده‌اند.

نتیجه‌گیری کلی

پایگاه‌های داده مخزن بزرگی از داده‌های خام هستند که می‌توان با روش‌های جدید متاآنالیز، آن‌ها را ادغام و نتایج را تفسیر کرد. از آنجایی که در بیشتر مطالعات *in silico* تعداد نمونه به‌کار رفته کم است، امّا در روش‌های ادغامی داده‌ها مانند مطالعه حاضر، مطالعات مختلف تجمیع و تعداد نمونه‌ها افزایش می‌یابد. در نتیجه، نتایج گسترده‌تری به‌دست می‌آید. این مطالعه با ادغام داده‌های دو روش متفاوت، داده‌های بیان برای مقاطع سنی مهم را کنار هم فراهم آورد تا دیدی کلی از تفاوت‌های ترنسکریپتوم‌ها در بافت عضله گوسفند نژاد تکسل در دو مقطع مهم سنی را نشان دهد. در مجموع، در بافت عضله بین مقطع سنی بلوغ و جنینی بیان ۶۲ ژن (۳۷ ژن افزایش بیان و ۲۵ ژن کاهش بیان) در عضله به‌شکلی معنادار اختلاف داشت.



شکل ٤– ارتباط بین هستی‌شناسی ژن‌های افتراقی شناسایی شده بین مقاطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی

Figure 4- Relationship between the ontology of identified DEGs between Adult and 70 days embryonic age

نودهای کوچک ژن‌ها و نودهای بزرگ عبارات هستی شناسی هستند.

Small nodes are genes and large nodes are ontology terms.

جدول ٤- عبارات هستی شناسی شناسایی شده ژن‌های افتراقی بین مقاطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی

Table 4- The identified ontology terms of DEGs between adult and 70 days of embryonic age

شماره هستی‌شناسی ژن GO-ID	عبارات هستی‌شناسی ژن GO-term	طبقه Class	مقادیر-P P-value	بونفرونی Bonferroni	ژن‌های مرتبط Associated genes
GO:0001570	Vasculogenesis	BP	7.8E-4	5.5E-3	[AMOT, CAV1, CTNNB1]
GO:0034637	Cellular carbohydrate biosynthetic process	BP	2.1E-3	6.5E-3	[ISYNA1, PHKG2, PPP1R3C]
GO:0046425	Regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT	BP	4.3E-4	5.6E-3	[CAV1, PECAM1, PIGU]
GO:1904892	Regulation of receptor signaling pathway via STAT	BP	4.3E-4	5.6E-3	[CAV1, PECAM1, PIGU]
GO:0106106	Cold-induced thermogenesis	BP	1.5E-3	7.9E-3	[ACTN3, CAV1, MFN2, PRKAB2]
GO:0120161	Regulation of cold-induced thermogenesis	BP	2.2E-5	4.5E-4	[ACTN3, CAV1, MFN2, PRKAB2]
GO:0038166	Angiotensin-activated signaling pathway	BP	2.8E-4	3.9E-3	[AGTR2, CAV1, LOC101113341]
GO:0045778	Positive regulation of ossification	BP	5.4E-5	1.0E-3	[ACTN3, CTNNB1, SFRP2]
GO:1901863	Positive regulation of muscle tissue development	BP	1.6E-3	6.6E-3	[ACTN3, CTNNB1, ERBB3]
GO:0044449	Contractile fiber part	CC	2.8E-3	2.8E-3	[ACTN3, CTNNB1, PECAM1, TMOD4]
GO:0006937	Regulation of muscle contraction	BP	1.4E-3	8.6E-3	[ACTN3, CASQ1, CAV1, PLN]
GO:0048636	Positive regulation of muscle organ development	BP	5.3E-4	5.8E-3	[ACTN3, CTNNB1, ERBB3]
GO:0019722	Calcium-mediated signaling	BP	5.3E-4	5.3E-3	[ACTN3, CASQ1, ERBB3, NFAT5, PLN]
GO:0048016	Inositol phosphate-mediated signaling	BP	2.8E-4	3.9E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]
GO:0006942	Regulation of striated muscle contraction	BP	4.9E-4	5.9E-3	[ACTN3, CASQ1, CAV1, PLN]
GO:0045844	Positive regulation of striated muscle tissue development	BP	1.0E-4	1.7E-3	[ACTN3, CTNNB1, ERBB3]
GO:0033173	Calcineurin-NFAT signaling cascade	BP	4.9E-4	5.9E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]
GO:0106056	Regulation of calcineurin-mediated signaling	BP	7.2E-5	1.2E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]
GO:2001257	Regulation of cation channel activity	BP, MF	2.56E-4	3.8E-3	[CASQ1, CAV1, PLN]
GO:0070884	Regulation of calcineurin-NFAT signaling cascade	BP	1.2E-4	2.0E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]

با رسم شبکه ژنی بین ژن‌های افتراقی این دو مقطع در مجموع ۱۵ ژن منتخب MYH1، ACTN3، CASQ1، TMOD4، FBP2، SLC2A4، MX1، COX4I1، SOD2، MFN2، UQCRB، UCP3، PRKAB2، PHKG2، PPP1R3C شناسایی شد.عملکرد این ژن‌ها به نحوی در تکثیر سلولی، سنتز پروتئین‌ها، تشکیل و سازماندهی میوفیبریل‌ها (در مقطع سنی جنینی) و متابولیسم‌های چربی‌زایی (در مقطع سنی بلوغ) ثابت شده است. آنالیز غنی‌سازی ژن-های افتراقی شناسایی شده برخی از فرآیندهای زیستی مثل عروق-زایی، تنظیم مثبت استخوان‌سازی، تنظیم مثبت رشد اندام عضلانی، تنظیم اقباض عضلات مخطط، بخش فیبر انقباضی، علامت‌دهی به واسطه کلسیم، مسیرهای علامت‌دهی Calcineurin-NFAT و JAK-STAT ، عملکرد مولکولی تنظیم فعالیت کانال کاتیونی و در نهایت، اجزای سلولی فیبر انقباضی را آشکار کرد. این یافته‌ها می‌تواند منبعی مفید برای بررسی‌های زیستی ژن‌های مربوط به رشد عضله در گوسفند باشد و سرنخ‌هایی را برای درک مکانیسم‌های ژنتیکی مولکولی در دیگر نژادهای گوسفند در اختیارمان قرار دهد.

در نهایت، با توجه به اینکه نتایج به‌دست آمده از روش ادغامی در این مطالعه در راستای مطالعات انفرادی هر یک از مجموعه عضله ریزآرایه و RNA-Seq و همچنین بررسی منابع صورت گرفته است، می‌توان گفت روش ادغام داده‌ها می‌تواند بسیاری از مطالعات ناقص را تکمیل و نتایج مفیدی ارائه دهد.

References

1. Almenar-Queralt, A., Lee, A., Conley, C. A., de Pouplana, L. R., & Fowler, V. M. (1999). Identification of a novel tropomodulin isoform, skeletal tropomodulin, that caps actin filament pointed ends in fast skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, *274(40)*,28466-28475. https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28466.
2. Badday Betti, S., Tahmoorespur, M., & Javadmanesh, A. (2022). Identification of lncRNAs expression and their regulatory networks associated with development and growth of skeletal muscle in sheep using RNA-Seq. *Agriculture and Natural Resources*, *56*(2),373-386. https://doi.org/10.34044/j.anres.2022.56.2.15
3. Bakhshalizadeh, S., Zerehdaran, S., & Javadmanesh, A. (2021). Meta-analysis of genome-wide association studies for somatic cells score trait in dairy cows. *Journal of Ruminant Research*, 9(3),39-58. https://doi.org/10.22069/ejrr.2021.19036.1787. (in persian)
4. Beggs, A. H., Byers, T. J., Knoll, J. H., Boyce, F. M., Bruns, G. A. & Kunkel, L. M. (1992). Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(13), 9281–8.
5. Betti, S., Tahmoorespur, M. & Javadmanesh, A. (2022). Alternative Splicing Novel lncRNAs and Their Target

Genes in Ovine Skeletal Muscles. *Journal of Cell and Molecular Research*, 13(2), 129-136. https://doi.org/10.22067/jcmr.2022.74635.1027

6. Boss, O., Giacobino, J. P. & Muzzin, P. (1998). Genomic structure of uncoupling protein-3 (UCP3) and its assignment to chromosome 11q13. *Genomics*, 47 (3), 425–6. https://doi.org/10.1006/geno.1997.5135.
7. Cheung, P. C., Salt, I. P., Davies, S. P., Hardie, D. G. & Carling, D. (2000). Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochemical Journal*, *346*(3), 659-669. https://doi.org/10.1042/bj3460659.
8. Doherty, M. J., Young , P. R. & Cohen , P. T. (1997). Amino acid sequence of a novel protein phosphatase 1 binding protein (R5) which is related to the liver- and muscle-specific glycogen binding subunits of protein phosphatase 1. *FEBS letters*, *399*(3), 339-343. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01357-9.
9. Filadi, R., Pendin, D. & Pizzo, P. (2018). Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death* & *Disease*, 9(3), 330. https://doi.org/10.1038/s41419-017-0023-6.
10. Horisberger, M. A. (1992). Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *Journal of Virology*, *66*(8), 4705-4709. https://doi.org/10.1128/JVI.66.8.4705-4709.1992 .
11. Huang, C. Y., Yuan , C. J., Livanova, N. B. & Graves, D. J. (1994). Expression, purification, characterization, and deletion mutations of phosphorylase kinase gamma subunit: identification of an inhibitory domain in the gamma subunit. *Reversible Protein Phosphorylation in Cell Regulation*, 7–18. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2600-1_1.
12. Huang, S. & Czech, M. P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), 237–52. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.03.006.
13. Hüttemann, M., Kadenbach, B. & Grossman, L. I. (2001). Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene*, 267(1), 111–23. https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00385-7 .
14. Jung, H. J., Kim, K. H., Kim, N. D., Han, G. & Kwon, H. J. (2011). Identification of a novel small molecule targeting UQCRB of mitochondrial complex III and its anti-angiogenic activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *21*(3), 1052-1056. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.12.002.
15. Jung, J., Mok, C., Lee, W. & Jang, W. (2017). Meta-analysis of microarray and RNA-Seq gene expression datasets for carcinogenic risk: An assessment of Bisphenol A. *Molecular & Cellular Toxicology*, 13(2), 239-249. https://doi.org/10.1007/s13273-017-0026-5.
16. Kamali S., Javadmanesh, A., Stelinski, L, L, Kyndt, T., Seifi, A., Cheniany, M., Zaki-Aghl,, M., Hosseini, M., Heydarpour, M., Asili, J. & Karimi , J. (2022). Beneficial worm allies warn plants of parasite attack below-ground and reduce above-ground herbivore preference and performance. *Molecular Ecology*, *31*(2), 691-712. https://doi.org/10.1111/mec.16254. (in persian)
17. Liu, N., He, J. N., Yu, W. M., Liu, K. D., Cheng, M., Liu, J. F., He, Y. H., Zhao, J. S. & Qu, X. X.. (2015). Transcriptome analysis of skeletal muscle at prenatal stages in Polled Dorset versus Small-tailed Han sheep. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 1085-1095. https://doi.org/10.4238/2015.February.6.12.
18. Ma, T., Liang, F., Oesterreich, S. & Tseng, G. C. (2017). A joint bayesian model for integrating microarray and RNA sequencing transcriptomic data. *Journal of Computational Biology*, 24(7), 647-662. https://doi.org/10.1089/cmb.2017.0056.
19. Mohammadi, F., Tahmoorespur, M. & Javadmanesh, A. (2019). Study of differentially expressed genes, related pathways and gene networks in sheep fetal muscle tissue in thin- and fat-tailed breeds, *Animal Science Journal*, 32(123), 301-312. https://doi.org/10.22092/asj.2018.122913.1749. (In Persian).
20. Rakus, D., Maciaszczyk, E., Wawrzycka, D., Ułaszewski, S., Eschrich, K. & Dzugaj, A. (2005). The origin of the high sensitivity of muscle fructose 1,6-bisphosphatase towards AMP. *FEBS letters*, 579(25), 5577-5581. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.021.
21. Rashidian, Z., Dehdilani, N., Dehghani, H, & Javadmanesh, A. (2020). Isolation and culturing myogenic satellite cells from ovine skeletal muscle. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 12(2), 36-43. https://doi.org/10.22067/veterinary.v12i2.82979. (In Persian).
22. Sadkowski, T., Jank, M., Oprzadek, J. & Motyl, T. (2006). Agedependent changes in bovine skeletal muscle transcriptomic profile. *Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society*, 57, 95-110.
23. Saedi, N., Aminafshara, M., Chamania, M., Honarvar, M. & Javadmanesh, A. (2022). Expression pattern and network visualization of genes involved in milk persistency in bovine mammary tissue. *Agriculture and Natural Resources*, 56(1), 23-34. https://doi.org/10.34044/j.anres.2021.56.1.03
24. Sahraei, S., Nassiri, M. R., Javadmanesh, A., Tohidi, R. & Ebrahimie, E. (2019). Investigation of gene expression and gene networks related to apoptosis in sensitive and resistant Aryan broiler breeders with RNA-Seq. *Animal Production Research*, 8(1), 53-66.(in persian)
25. Sun, L., Bai, M., Xiang, L., Zhang, G., Ma, W. & Jiang, H. (2016). Comparative transcriptome profiling of longissimus muscle tissues from Qianhua Mutton Merino and Small Tail Han sheep. *Scientific Reports*, 6, 33586.
26. Takada, F., Vander Woude, D. L., Tong, H. Q., Thompson, T. G., Watkins, S. C., Kunkel, L. M. & Beggs, A. H.

(2001). Myozenin: an alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1595-1600. https://doi.org/10.1073/pnas.041609698.

27. Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Györke, I., Volpe, P., Williams, S. C. & Györke, S. (2003). Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: mechanism for hereditary arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11759-11764. https://doi.org/10.1073/pnas.1932318100.
28. Weiss, A., Schiaffino, S. & Leinwand, L. A. (1999). Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity. *Journal of Molecular Biology*, 290 (1), 61–75. https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2865.
29. Yan, X., Zhu, M. J., Dodson, M .V. & Du, M. (2013). Developmental programming of fetal skeletal muscle and adipose tissue development. *Genomics*, 1: 29–38. https://doi.org/10.7150/jgen.3930.
30. Zelko, I. N., Mariani, T. J. & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00905-x.
31. Zerehdaran, S., Ghobakhloo, F., Jabbari Nooghabi, M. & Shariati, M. (2020). Meta-Analysis of studies on genetic parameters of economic traits in Iranian Holstein dairy cows. *Journal of Ruminant Research*, 8(2), 1-22. https://doi.org/10.22069/ejrr.2020.16994.1703. (In Persian).
32. Zhang, Ch., Wang, G., Wang, J., Ji, Zh., Liu, Zh., Pi, Xi. & Chen, C. (2013). Characterization and Comparative Analyses of Muscle Transcriptomes in Dorper and Small-Tailed Han Sheep Using RNA-Seq Technique. *PLOS ONE Journal*, 8 (8), 72686.